

Министерство науки и высшего образования РФ
Правительство города Севастополя
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр
«Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»
Всероссийское гидробиологическое общество при Российской академии наук
Русское географическое общество
Паразитологическое общество при Российской академии наук

Изучение водных и наземных экосистем: история и современность

Международная научная конференция, посвящённая 150-летию
Севастопольской биологической станции —
Института биологии южных морей имени А. О. Ковалевского
и 45-летию НИС «Профессор Водяницкий»

Тезисы докладов

13–18 сентября 2021 г.
Севастополь, Российская Федерация

Севастополь
ФИЦ ИНБЮМ
2021

Влияние осмотического стресса на морфофункциональные параметры гемоцитов двустворчатого моллюска *Anadara kagoshimensis*

Кладченко Е. С., Андреева А. Ю., Рычкова В. Н.

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», Севастополь, Россия

kladchenko_ekaterina@bk.ru

Стрессовые факторы окружающей среды негативно влияют на способность моллюсков к иммунному ответу. Следовательно, в результате солёностного стресса возникают вспышки заболеваний на марикультурных фермах. Кратковременные колебания солёности могут стать причиной роста финансовых потерь на устрично-мидийных фермах. Последнее обуславливает актуальность поиска объектов культивирования с широким диапазоном солёностной толерантности. Для региональной марикультуры Крыма перспективным объектом в контексте солёностной адаптации может стать двустворчатый моллюск анадара (*Anadara kagoshimensis*).

Цель настоящей работы — оценить осмотический адаптивный потенциал перспективного объекта региональной марикультуры Черноморского региона *A. kagoshimensis*.

Объектом исследования являлись двустворчатые моллюски (*A. kagoshimensis*). В работе исследовано 50 особей массой ($16,6 \pm 1,2$) г и диаметром створки ($31,5 \pm 1,1$) мм. Моллюски отбирались весной 2021 г. в прибрежной акватории г. Севастополя (температура воды $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$; солёность 18,3 ‰; содержание кислорода $8,5\text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$). Моллюсков доставляли в лабораторию в пластиковых контейнерах без воды. В лаборатории анадара рассаживали в аквариумы, плотность посадки составляла 3–5 л на особь. В аквариумах поддерживались условия, близкие к точке сбора материала: температура ($23,3 \pm 0,1$) $^{\circ}\text{C}$; солёность ($18,2 \pm 0,02$) ‰; pH ($8,1 \pm 0,01$); содержание кислорода ($7,7 \pm 0,1$) $\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$. Солёность и pH контролировали при помощи солемера ST20S (Ohaus, США) и pH-метра ST2100-F (Ohaus, США). Содержание кислорода и температуру воды контролировали при помощи портативного кислородомера с температурным датчиком ST300D (Ohaus, США).

Для оценки диапазонов солёностной адаптации моллюсков разделили на 5 групп по 10 особей в каждой. Контрольная группа содержалась при солёности 18 ‰, экспериментальные — при 8, 14, 35 и 45 ‰. Экспериментальное снижение солёности (точки 14,8 и 8,8 ‰) достигалось путём разбавления морской воды дистиллированной со скоростью ($1,3 \pm 0,3$) % в сутки. После достижения необходимых значений солёности моллюсков выдерживали в заданных экспериментальных условиях 2 дня. Для повышения солёности до 35 и 45 ‰ в экспериментальные аквариумы постепенно добавляли соль (Red sea salt, Франция). Солёность повышалась со скоростью ($0,8 \pm 0,2$) ‰ в час. После достижения солёности 35 ‰ (через 6 дней, без учёта периода акклиматизации) и 45 ‰ (ещё через 4 дня) экспозиция в экспериментальных условиях составляла 2 дня. На протяжении всего эксперимента, включая период акклиматизации к лабораторным условиям, для удаления метаболитов ежедневно меняли воду, с сохранением значения солёности. Моллюсков кормили смесью микроводорослей (*Tetraselmis viridis* (штамм IBSS-25) из коллекции отдела биотехнологии и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ, 5–10 мл смеси на каждые 50 л аквариумной воды). Температура воды, содержание кислорода и значение pH поддерживались на уровне контроля в течение всего экспериментального периода.

Оценка способности гемоцитов к спонтанной продукции активных форм кислорода проводилась при помощи метода проточной цитометрии по флуоресценции красителя 2',7'-дихлор-

флуоресцеин диацетата (DCF-DA); 1 мл суспензий гемоцитов инкубировали с 10 мкл раствора DCF-DA в течение 40 минут в темноте. Финальная концентрация красителя в пробе составляла $10 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$. Флуоресценция красителя анализировалась в канале FL1.

Митохондриальный потенциал оценивали по флуоресценции гемоцитов, окрашенных красителем родамином 123 (Rh123); 1 мл суспензии гемоцитов инкубировали с 10 мкл $\cdot \text{мл}^{-1}$ Rh123 при $+5^\circ \text{C}$ в темноте в течение 45 минут (конечная концентрация красителя в пробе $0,1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$). Интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных Rh123, оценивали в канале FL1.

Степень гемолиза определяли на основе регистрации рассеянного частицами света под разными углами. Исследование осмотической хрупкости проводили путём серийных разведений клеточных суспензий дистиллированной водой (по 1–2 мл) с постепенным снижением осмолярности и добавлением соответствующего объёма гемоцитов для поддержания константы концентрации клеток. Для контрольной группы осмолярность снижали с 485 до $20 \text{ мОсм} \cdot \text{л}^{-1}$; для моллюсков, инкубированных при 8 ‰, — с 404 до $7 \text{ мОсм} \cdot \text{л}^{-1}$. На каждой ступени разбавления осмолярность контролировали криоскопическим осмометром Osmomat 030 (Gonotec, Германия). Диапазон осмолярности от 461 до $55 \text{ мОсм} \cdot \text{л}^{-1}$ был использован для построения классической кривой осмотической хрупкости. Процент гемолиза рассчитывали исходя из 100%-ного гемолиза на наиболее гипосмотической стадии теста — $55 \text{ мОсм} \cdot \text{л}^{-1}$. Для количественного описания осмотической хрупкости гемоцитов *A. kagoshimensis* использовалась точка 50 % гемолиза (H50), отражающая осмолярность среды, при которой наблюдается лизис 50 % клеток в образце.

Достоверность различий между группами оценивали в программе RStudio v4.0.5 с использованием дисперсионного анализа ANOVA и *U*-критерия Манна — Уитни. Результаты представлены в виде ($\bar{x} \pm SE$) (среднее и ошибка среднего).

Снижение солёности с 18 до 14 ‰ и повышение не оказали воздействия на способность генерировать АФК. У группы моллюсков, содержащихся при солёности 8 ‰, напротив, зафиксировано увеличение флуоресценции красителя DCF более чем в 2,4 раза ($p \leq 0,05$) по сравнению с контрольным уровнем. При повышении солёности до 35 ‰ у гемоцитов снижалась общая способность к продукции АФК более чем на 30 % ($p \leq 0,05$); дальнейшее повышение солёности индуцировало увеличение способности к продукции АФК на 11 % ($p \leq 0,05$) в сравнении с контрольным уровнем. У группы моллюсков, содержащихся при 14 и 35 ‰, митохондриальный потенциал соответствовал контрольным значениям. Снижение солёности до 8 ‰ и повышение до 45 ‰ индуцировали увеличение флуоресценции красителя Rh123 в 1,3 и 2,5 раза ($p \leq 0,05$) соответственно. Значение H50 контрольной группы моллюсков составило $(47,3 \pm 5,4) \text{ мОсм} \cdot \text{л}^{-1}$. Значение H50 уменьшалось по мере снижения солёности; у группы моллюсков, содержащихся при 8 ‰, оно составило $(16,2 \pm 2) \text{ мОсм} \cdot \text{л}^{-1}$. У моллюсков, инкубированных в условиях гиперосмотической нагрузки, значение H50 увеличилось: для группы 35 ‰ оно составило $(90,5 \pm 8,6) \text{ мОсм} \cdot \text{л}^{-1}$, а для 45 ‰ — $(124,2 \pm 15,8) \text{ мОсм} \cdot \text{л}^{-1}$.

Снижение способности гемоцитов к генерации окислительного взрыва и сохранение митохондриального потенциала на уровне контрольных значений после инкубации при 35 ‰ указывают на развитие компенсаторного ответа к солёностному стрессу. Кроме того, значения исследуемых показателей в группе 14 ‰ сохранились на уровне контрольных значений; а значит, солёность 35 и 14 ‰ входит в границы осмотической толерантности. Повышение солёности до 45 ‰ и снижение до 8 ‰, напротив, индуцировали окислительный стресс. Кроме того, у моллюсков, адаптировавшихся к гиперосмотическим условиям, клетки лизировали при большей осмолярности. У анадары из гипосмотических условий гемоциты лизировали при меньшей осмолярности. Осмотическая стойкость гемоцитов анадары зависит от солёности, в которой содержались моллюски.